高成功率PCR酵素「KOD FXシリーズ」を用いた植物種子からの簡便な増幅例

東洋紡（株）　敦賀バイオ研究所　小林 哲大

はじめに

植物遺伝子のスクリーニングにおける簡便な増幅方法として、植物サンプルを前処理して得られるライセートをテンプレートとしたPCRを行う方法が盛んに行われています。しかし種子の場合は固い種皮を持つため、DNAを溶出させることが困難であり、さらに種類によっては多糖などのPCR阻害物質を多量に含むため、ライセートを用いるPCRは難しいとされてきました。

そこで今回、クルードサンプルの増幅に優れるPCR酵素『KOD FXシリーズ』を用い、硬い種皮を有し、PCR阻害物質を多く含むことが知られているワタの種子の効果的なライセートの調製方法と高効率な増幅について検討を行いました。

さらに、その方法をニンジン、ホウレンソウ、ブドウなど様々な植物種の種子の遺伝子解析に応用する検討も行いました。

以下、ご紹介いたします。

方　法

(1) 種子ライセートの調製（ワタ種子）

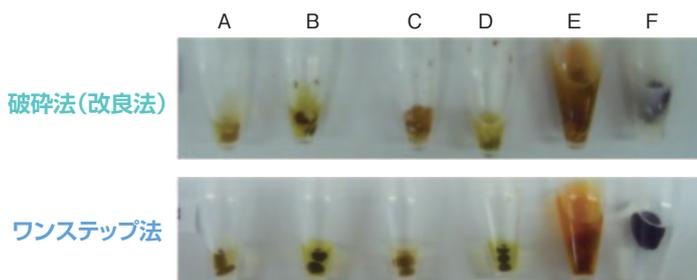
破砕法（改良法）、ワンステップ法、X社PCRキット添付の前処理液を比較しました。

＊複数の種子を処理する場合は、コンタミネーションを防ぐため種子をラップなどで包んでから砕くことをお薦めします。
＊＊参考文献：*Bio Techniques*, **19**:394 (1995)

(2) 様々な種子からのDNA溶出

様々な種子で破砕法とワンステップ法を比較しました。

種子の大きさに応じてBufferAの量を調整（種子が浸る程度のBuffer量で実施）し、溶出方法は上記と同様に行いました。

	種子名	種子数	BufferA量
A	ニンジン	2粒	100μl
B	キャベツ	2粒	100μl
C	ホウレンソウ	2粒	100μl
D	ハクサイ	3粒	100μl
E	ブドウ	1粒	200μl
F	ナシ	1粒	200μl

(3) PCR

【反応液組成】

PCR grade water	10 μl
2×PCR Buffer	25 μl
2mM dNTPs	10 μl
10pmol/μl Primer #1	1.5 μl
10pmol/μl Primer #2	1.5 μl
KOD FX or KOD FX Neo	1 μl
溶出液上清	1 μl
Total reaction volume	50 μl

※X社PCRキットは取扱説明書推奨の条件にてPCRを実施し比較を行いました。ただし、サイクル条件は40サイクルで行いました。

【サイクル条件】

94℃, 2 min.
98℃, 10 sec. ┐
68℃, 1 min./kb ┘ 40 cycles
4℃, Hold

〈ワタ種子〉

ターゲット：gibberellin 20-oxidase 1.5kb
Primer #1：TGCTTCCATCAACTGCTGCTGT
Primer #2：TCAGCACGGTAATGGTTCTGTGTG

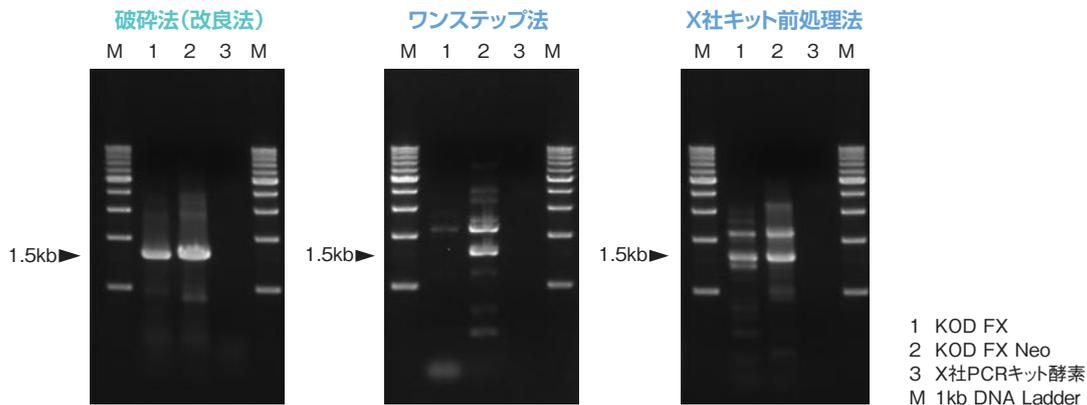
〈その他種子〉

ターゲット： rbcL1.3kb
Primer #1： ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC
Primer #2： AAGCAGCAGCTAGTTCCGGGCTCCA

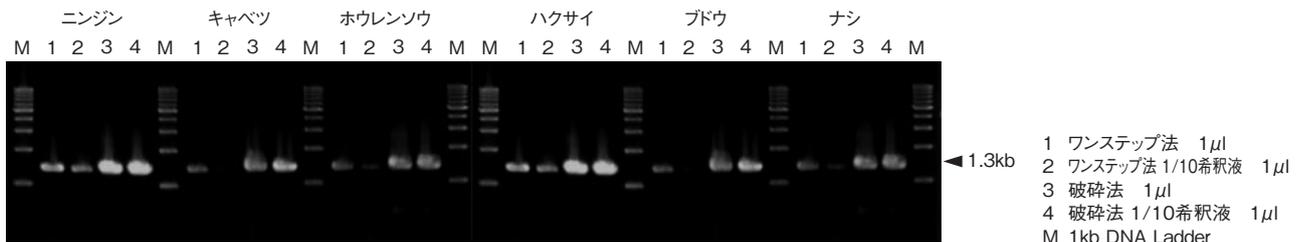
結果および考察

今回行った3種類の調製法のうち、破砕法を用いた場合でのみ種皮を破壊することができ、結果的に種子内部の胚や胚乳の成分を含んだライセートを調製することが可能でした。一方、他の手法では種皮を破壊することができず、主に種子表面の成分のみを含むライセートが得られる結果となりました。

(1) ワタ種子からの増幅

1 KOD FX
2 KOD FX Neo
3 X社PCRキット酵素
M 1kb DNA Ladder

PCR産物5μlを1%アガロースゲルにて解析した結果、KOD FXシリーズを用いたもののみに目的遺伝子の増幅を認めることができました。特に、破砕法のライセートを用いた場合に特異性の高い良好な結果を得ることができました。他の方法のライセートを用いた場合、原因不明の非特異バンドが生じましたが、これはライセートが胚や胚乳の成分を含まなかったことに起因している可能性があります。

(2) 様々な種子からの増幅

1 ワンステップ法 1μl
2 ワンステップ法 1/10希釈液 1μl
3 破砕法 1μl
4 破砕法 1/10希釈液 1μl
M 1kb DNA Ladder

次に、ワタの実験で最も良好な増幅を示したKOD FX Neoを用い、野菜や果物計6種類の種子を破砕法とワンステップ法で調製したライセートからの増幅を試みました。その結果、すべての植物種において、破砕法の方が良好な結果が得られ、破砕法を用いるライセート調製法は様々な種子に応用できることが分かりました。

まとめ

植物種子は、硬い種皮に覆われ、さらに多糖などのPCR阻害物質を多く含むため、ライセートを用いるPCRは不向きとされてきましたが、破砕法とKOD FX シリーズを用いることにより様々な種子を用いて簡便に遺伝子解析が可能となることが分かりました。